

1/5/2 (Item 2 from file: 351)
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

012266775

WPI Acc No: 1999-072881/199907

Related WPI Acc No: 2001-185141

XRAM Acc No: C99-021866

New sialyltransferase (SAT-1) polypeptide and polynucleotide
- useful for

synthesis of ganglioside GM3, which participates in cell
proliferation/differentiation, and is a precursor for
vertebrate

gangliosides

Patent Assignee: SEIKAGAKU KOGYO CO LTD (SEGK); SAITO M
(SAIT-I)

Inventor: SAITO M

Number of Countries: 027 Number of Patents: 004

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date |
|----------------|------|----------|---------------|------|----------|
| Week | | | | | |
| EP 890645 | A2 | 19990113 | EP 98305422 | A | 19980708 |
| 199907 B | | | | | |
| JP 11018778 | A | 19990126 | JP 97184184 | A | 19970709 |
| 199914 | | | | | |
| US 6555371 | B1 | 20030429 | US 98112563 | A | 19980709 |
| 200331 | | | US 99425488 | A | 19991022 |
| US 20030087396 | A1 | 20030508 | US 98112563 | A | 19980709 |
| 200337 | | | US 99425488 | A | 19991022 |
| | | | US 2002309389 | A | 20021203 |

Priority Applications (No Type Date): JP 97184184 A 19970709;

JP 99148603 A

19990527

Patent Details:

| Patent No | Kind | La | Pa | Main IPC | Filing Notes |
|-----------|------|----|----|----------|--------------|
|-----------|------|----|----|----------|--------------|

| | | | | | |
|-----------|----|---|----|-------------|--|
| EP 890645 | A2 | E | 21 | C12N-015/54 | |
|-----------|----|---|----|-------------|--|

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR
GB GR IE IT

LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

| | | | |
|-------------|---|----|-------------|
| JP 11018778 | A | 14 | C12N-015/09 |
|-------------|---|----|-------------|

| | | | | |
|------------|----|--|-------------|-----------------------|
| US 6555371 | B1 | | C12N-015/54 | CIP of application US |
| 98112563 | | | | |

| | | | | |
|----------------|----|--|-------------|-----------------------|
| US 20030087396 | A1 | | C12P-021/06 | CIP of application US |
| 98112563 | | | | |

| | | | | |
|----------|--|--|--|------------------------|
| 99425488 | | | | Cont of application US |
|----------|--|--|--|------------------------|

Abstract (Basic): EP 890645 A

A sialyltransferase (SAT-1) having the following physio-chemical properties is new: (i) Activity: transfers sialic acid from a donor selectively to a 3-hydroxyl group of a galactose residue contained in lactosylceramide as a sialic acid acceptor to produce ganglioside GM3;

(ii) optimal reaction pH: 6.0-7.0; and (iii) activation: the activity increases at least 1.5 times with the addition of 10 mM of Mn²⁺. Also claimed are SAT-1s with the above activity: (1) having a C-terminal amino acid sequence (II):

Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Glu-Gly-Val-Val-Glu-Asp-Leu-Ser-Gly-Gly-Ile-His

; (2) comprising sequence (III), a fully defined 48 amino acid sequence given in the specification; (3) comprising an amino acid sequence with substitutions, deletions, insertions or rearrangements of sequence (I); (4) having no transmembrane domain. Also claimed are: (5) a SAT-1 comprising sequence (I), a fully defined human 359 amino acid polypeptide given in the specification; and (6) a DNA (IV) and complementary DNA encoding all or a sialyltransferase-active part of (I).

USE - The new SAT-1 is useful for synthesis of ganglioside GM3, which participates in the proliferation/differentiation of cells and tissues, and is a precursor for vertebrate gangliosides.

Title Terms: NEW; POLYPEPTIDE; POLYNUCLEOTIDE; USEFUL; SYNTHESIS;

GANGLIOSIDE; CELL; PROLIFERATION; DIFFERENTIAL; PRECURSOR; VERTEBRATE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09; C12N-015/54; C12P-021/06

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C08B-037/00;

C12N-001/21; C12N-009/10; C12P-019/26

File Segment: CPI

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-18778

(43)公開日 平成11年(1999)1月26日

(51)Int.Cl.⁶
C 12 N 15/09
9/10識別記号
ZNAF I
C 12 N 15/00
9/10

ZNA

審査請求 未請求 請求項の数10 OL (全14頁)

(21)出願番号 特願平9-184184

(22)出願日 平成9年(1997)7月9日

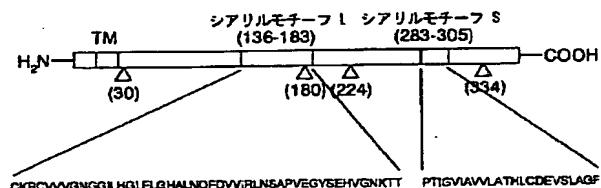
(71)出願人 000195524
生化学工業株式会社
東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
(72)発明者 斎藤 政樹
東京都港区六本木6丁目6-2
(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54)【発明の名称】 シアル酸転移酵素及びそれをコードするDNA

(57)【要約】

【課題】 ラクトシルセラミドのガラクトース残基にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を合成する酵素及びその酵素をコードするDNAを提供する。

【解決手段】 癌細胞を分化誘導剤で処理することにより分化させ、分化した癌細胞からcDNAライブラリーを作成して宿主細胞に導入し、ガングリオシドを細胞膜上に発現した宿主細胞を検出し、上記で検出された宿主細胞をソーティングしてライブラリーを濃縮して、濃縮したライブラリーから導入した遺伝子を切り出す。



1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有するシアル酸転移酵素。

①作用：シアル酸供与体から、シアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を生成する。

②至適反応pH：pH 6.0～7.0。

③阻害及び活性化：1.0 mMのMn²⁺により活性が1.5倍以上に上昇する。

【請求項2】 下記①の理化学的性質を有し、アミノ酸配列のC末端に配列番号5のアミノ酸配列を有するシアル酸転移酵素。

①作用：シアル酸供与体から、シアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を生成する。

【請求項3】 下記①の理化学的性質を有し、配列番号6のアミノ酸配列を有するシアル酸転移酵素。

①作用：シアル酸供与体から、シアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を生成する。

【請求項4】 シアル酸供与体が、シチジン-5-モノリン酸-シアル酸(CMP-シアル酸)である請求項1～3のいずれか一項記載のシアル酸転移酵素。

【請求項5】 ヒト由来である請求項1～4のいずれか一項記載のシアル酸転移酵素。

【請求項6】 以下の(a)又は(b)のポリペプチドを含むシアル酸転移酵素。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつシアル酸供与体からシアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を生成する酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項7】 請求項1～6記載のシアル酸転移酵素を形成するポリペプチド。

【請求項8】 以下の(a)もしくは(b)のポリペプチド又はその部分からなるポリペプチド。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつシアル酸供与体からシアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガング

リオシドGM₃を生成する酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項9】 少なくとも膜貫通領域を欠失し、かつシアル酸供与体からシアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を生成する酵素活性を有する請求項7又は8記載のポリペプチド。

【請求項10】 請求項7～9のいずれか一項記載のポリペプチドの全部又は部分をコードするDNA。

10 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、シアル酸転移酵素及びそれをコードするDNAに関する。より詳細にはラクトシルセラミドのガラクトース残基にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を合成する酵素及びその酵素をコードするDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】 ヒト骨髓性白血病細胞株HL-60は悪性転換により無限増殖能を獲得した細胞株であり、白血病細胞のモデルとして一般的に広く用いられている(Collins, S.J., Gallo, R.C., and Gallagher, R.E., *Nature (London)*, 270, 347-349(1977); Collins, S.J., *Blood*, 70, 1223(1987))。上記細胞株は、培養を続けた際にも分化することはなく未分化な細胞のまま増殖を続けるが、上記細胞株の培養培地に分化誘導剤として広く用いられているホルボールエステルを添加して培養を続けると、細胞増殖を停止し、単球或いはマクロファージと同様な形態を示すようになり、分化が誘導される。その過程でガングリオシドの一種であるGM₃量が顕著に増大すること(Nojiri, H., Takaku, F., Tetsuka, T., and Saito, M., *Blood*, 64, 534-541(1984))、及び上記ガングリオシドGM₃を外来性に添加した際もホルボールエステルを添加した際と同様の変化、すなわち単球系分化が細胞に起こることが報告されている(Saito, M., Terui, Y., and Nojiri, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 132, 223-231(1985))。また、この分化の過程において、GM₃そのものが分化誘導活性を有していること(Nojiri, H., Takaku, F., Miura, Y., and Saito, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 782-786(1986))、さらに化学合成GM₃によっても分化が誘導されることが証明されている(Sugimoto, M. and Ogawa, T., *Glycoconj. J.*, 2, 5-9(1985); Saito, M., Nojiri, H., Ogino, H., Yuo, A., Ogura, H., Itoh, M., Tomita, K., Ogawa, T., Nagai, Y., and Kitagawa, S., *FEBS Lett.*, 271, 85-88(1990))。

【0003】 一方、シアル酸含有糖脂質、その中でも特にガングリオシドが様々な生物現象において重要な機能を担っていることが明らかとなり、その機能のみならず生合成が解明されつつある。脊椎動物において、多くのガングリオシド(ガングリオ系ガングリオシド)は主要

ガングリオシドのうちで最も単純な構造を持つGM₃を共通の前駆体としており、主要な機能を持つガングリオシドの生合成の根幹をGM₃の合成がなしている。

【0004】上述のようにガングリオシドGM₃はそれ自体が細胞・組織の増殖・分化に関与するとともに脊椎動物においては様々な機能を有するより高級なガングリオシド群の前駆体となっていることが示唆されている。

【0005】GM₃は、CMP-シアル酸：ラクトシルセラミドシアル酸転移酵素(CMP-NeuAc:Galβ1-4Glcβ1-1'Cerα2,3-sialyltransferase:SAT-1)によってラクトシルセラミド中のガラクトース残基にシアル酸が転移することによってラクトシルセラミドから合成されると考えられているが、当該酵素の単離、またその遺伝子も特定されていない。

【0006】ガラクトシド構造にシアル酸をα2-3ケトシド結合を介して転移する酵素としては、Wienstein et al., J. Biol. Chem., 257, 13835(1982)、Gillespie et al., Glycoconj., 7, 469(1990)、Gillespie, W., Kelly, S. and Paulson, J.C., J. Biol. Chem., 267, p21001-21010(1992)、Lee, Y.C., Kojima, N., Wada, E., Kurosawa, N., Nakaoka, T., Hashimoto, T. and Tsuji, S., J. Biol. Chem., 269, p10028-10033(1994)、Kim, Y.J., Kim, K.S., Kim, S.H., Kim, C.H., Ko, J.H., Choe, I.S., Tsuji, S. and Lee, Y.C., Biochem. Biophys. Res. Commun., 228, p324-327(1996)、特開平5-336963号公報などが知られているが、いずれの酵素もGM₃の合成への関与は知られておらず、ラクトシルセラミドにシアル酸をα2-3ケトシド結合で転移する酵素活性を示してはいない。Sandhoff, K.らは、α2-8シアル酸転移酵素(SAT-4)と、GM₃を合成する酵素が同一であると推定している(J. Biol. Chem., 268, 5341(1993))が、それは間接的な方法に基づく推定であり、物質として同一であることを裏付けているものではない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】ガングリオシドGM₃の重要性が明らかになるにつれてその生合成を解明、制御する試みがなされてきたが、GM₃の合成に深く関わる上記シアル酸転移酵素はその酵素タンパク質精製の困難性のため未だ単離されておらず、遺伝子発現調節機構はもとより、タンパク質化学的解析及び酵素学的解析でさえ未だなされていない。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記シアル酸転移酵素の遺伝子発現調節機構、タンパク質化学的解析及び酵素学的解析を進めることにより、細胞分化の制御を解明すべく鋭意検討を重ねた結果、発現クローニング法により上記GM₃合成に関与するシアル酸転移酵素をコードする塩基配列を有するcDNAの単離に成功し、当該cDNAの塩基配列をもとに上記シアル酸転移酵素の構造を明らかにした。その結果、当該酵素が既知

のシアル酸転移酵素と比して相同性が低く、また前記Sandhoff, K.らが同一と推定したα2-8シアル酸転移酵素とも別の新規酵素であることが明らかとなった。

【0009】すなわち、本発明は以下の性質を有するシアル酸転移酵素及びそれをコードする塩基配列を有するDNAを提供する。

①作用：シアル酸供与体から、シアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を生成する。

②至適反応pH: pH 6.0 ~ 7.0。

③阻害及び活性化：10 mMのMn²⁺により活性が1.5倍以上に上昇する。

【0010】また、上記作用を有し、アミノ酸配列のC末端に配列番号5のアミノ酸配列を有するシアル酸転移酵素及びそれをコードするDNA、並びに、上記作用を有し、配列番号6のアミノ酸配列を有するシアル酸転移酵素及びそれをコードするDNAを提供する。

【0011】シアル酸供与体は、好ましくは、シチジン-5-モノリン酸-シアル酸(CMP-シアル酸)である。上記酵素及びDNAは哺乳類由来が好ましく、ヒト由来が最も好ましい。

【0012】また、本発明は以下の(a)又は(b)のポリペプチドからなるシアル酸転移酵素及びそれをコードするDNAも提供する。

(a)配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b)アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつシアル酸供与体からシアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を生成する酵素活性を有するポリペプチド。

【0013】本発明のDNAとして具体的には、配列番号2のアミノ酸配列の全てをコードする塩基配列又はその部分配列を有するDNAが挙げられ、例えば配列番号1の塩基配列を有するDNAが挙げられる。

【0014】さらに本発明は、上記DNAの塩基配列によってコードされるシアル酸転移酵素のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチドを提供する。本ポリペプチドは膜貫通領域を欠失していてもよい。

【0015】なお、本明細書において「酵素をコードする」とは、当該酵素のポリペプチドをコードすることを意味する。また、本明細書では、以下、シアル酸供与体からシアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を生成する活性を有する本発明のシアル酸転移酵素を便宜的にシアル酸転移酵素-1又はSAT-1とも記載する。

【0016】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の実施の形態を説明する。

<1>本発明のシアル酸転移酵素-1をコードするDNA（本発明DNA）

本発明DNAには、それが有する塩基配列によってコードされるポリペプチドを含むシアル酸転移酵素が以下のような理化学的性質を有するものが含まれる。

①作用：シアル酸供与体から、シアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を生成する。すなわち、上記シアル酸受容体のガラクトース残基の3位の水酸基以外には実質的にシアル酸を転移しない。シアル酸供与体としてはCMP-シアル酸が好適には挙げられる。

②至適反応pH：本酵素は、実施例中に記載の酵素活性測定方法において、酵素反応液のpH 6.0～7.0の範囲、特にpH 6.5付近で高いシアル酸転移活性を有する。

③阻害及び活性化：1.0 mM Mn²⁺存在下で、非存在下と比して1.5倍以上に活性が上がる。

【0017】また、本発明DNAには、それが有する塩基配列によってコードされるポリペプチドを含むシアル酸転移酵素が、上記①の作用を有し、アミノ酸配列のC末端に配列番号5のアミノ酸配列を有するもの、並びに、上記①の作用を有し、配列番号6のアミノ酸配列を有するものも含まれる。配列番号6のアミノ酸配列はシアル酸転位酵素に存在するいわゆるシアルモチーフに相当する配列であり、通常には、シアル酸転移酵素のポリペプチドのアミノ酸配列において、配列番号2のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号136～183の部分に相当する部分に存在する。

【0018】本発明DNAには、以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードしているものが含まれ、これらのポリペプチドをコードしているのであればその塩基配列は特に限定されない。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは転位したアミノ酸配列からなり、かつシアル酸供与体からシアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドGM₃を生成する酵素活性を有するポリペプチド。

【0019】すなわち、配列番号2のアミノ酸配列は、シアル酸供与体から、シアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移する活性を実質的に害さない1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよく、そのようなアミノ酸配列の置換、欠失、挿入又は転位を有するポリペプチドをコードす

る、塩基配列の置換、欠失、挿入及び転位を有するDNAのいずれもが本発明DNAに包含される。本明細書における「アミノ酸の数個」とは当該酵素の活性が失われない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば360アミノ酸残基からなるポリペプチドの場合、20程度以下の数を示す。当該酵素の活性の測定法は公知の方法（特開平7-327678号公報）において宿主細胞に導入するcDNAと酵素の基質を変更することによって容易に行うことが可能であり、例えば本明細書中において具体的に示した方法により当業者であれば容易に実施可能であるため、目的とする酵素活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を容易に選択することができる。DNAの塩基配列の置換、欠失、挿入又は転位は、両末端に制限酵素切断末端を持ち、変異点の両側を含む配列を合成し、未変異DNAが有する塩基配列の相当する部分と入れ換えることにより、DNAに導入することができる。また、部位特異的変異法（Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350(1987); Kunkel, T.A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367(1987)）などの方法によても、DNAに置換、欠失、挿入又は転位を導入することができる。

【0020】本発明DNAとして具体的には配列番号2のアミノ酸配列の全てをコードする塩基配列又はその部分塩基配列を有するDNAが挙げられ、かつ好ましいがこれに限定はされない。上記の「部分塩基配列を有するDNA」とは、例えばシアル酸転移酵素-1のポリペプチドをコードするDNAとハイブリダイズレシアル酸転移酵素-1のDNAを検出するためのプローブとして使用することができる又はそれによってコードされるポリペプチドがシアル酸転移酵素-1活性を有するあるいはシアル酸転移酵素-1と同様の抗原性を有するDNAを示す。上記ハイブリダイズは、一般にスクリーニング等のDNA又はRNAとDNAをハイブリダイズさせる際に用いられている方法によって行えよう、例えば、DNAのスクリーニングなどに使用される条件としては、5.0%ホルムアミド、5×SSPE（塩化ナトリウム/リン酸ナトリウム/EDTA緩衝液）、5×デンハルト溶液（Denhaedt's solution）、0.5%SDSと50 μg/mlの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中で目的DNAをプレハイブリダイズし、³²Pラベルした本発明DNA（例えば配列番号1記載の塩基配列を有するDNA）を添加し、42℃で16時間ハイブリダイズさせた後、55℃で1×SSPE、1%SDS、さらに0.1×SSPE、0.1%SDSにより洗浄することが挙げられる。一般的なハイブリダイズは上述のような条件下で行われることが多いが、当業者であれば同様のハイブリダイズを目的として各溶液の組成や詳細な条件を変更することにより同様のハイブリダイズを行うことが可能であるため、同様な効果を得ることが可能な条件

であれば上述の条件に特に限定はされない。

【0021】本発明DNAが有する塩基配列としてより具体的には、配列番号1に示す全塩基配列又はその部分配列を有するDNAが挙げられ、かつ好ましい。このようなDNAとして具体的には、配列番号1における塩基番号202～1278の塩基配列からなるDNAが挙げられる。

【0022】配列番号1に示す塩基配列においては、シアル酸転移酵素-1のcDNAのオープンリーディングフレームの5'末端部に3つのイン・フレームのATGコドンが含まれている。3つのATGコドンの周囲の塩基配列は、全て-3の位置のプリンが保存されている。このことは効率的な翻訳に関するKozakの知見(Kozak, M. (1986)Cell, 44, 283-292)を満足しており、いずれのATGコドンも開始コドンとして機能する可能性がある。

【0023】ところで、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、フレーム内に2つのATGコドンを含むことが知られている(Nakazawa, K. et al. (1988)J. Biochem., 104, 165-168, Shaper, N. et al. (1988)J. Biol. Chem., 263, 10420-10428)。また、Shaperらは、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、2箇所からの翻訳開始の結果、長いものと短いものとの両方の形態が合成されることを示している。さらに、Lopezらは、長い形態のものは原形質膜を優先的に標的とし、短い形態のものは主としてゴルジ体内に存在することを示唆する証拠を示している(Lopez, L. et al. (1991)J. Biol. Chem., 266, 15984-15991)。同様に、シアル酸転移酵素-1についても、複数のATGコドンが開始コドンとして機能する可能性はあるが、定かではない。しかし、いずれのATGコドンが開始コドンであっても、上記のシアル酸転移酵素-1のポリペプチドをコードする点では同じであり、第2番目、第3番目のATGコドンから始まる塩基配列を有するDNAも本発明に包含されるものである。

【0024】配列番号1の最初のATGコドンで始まる单一のオープンリーディングフレームからは、359アミノ酸残基からなり、分子量41, 244Da、N-結合グリコシレーション部位である可能性がある2カ所の部位を有するタンパク質が予測される。このアミノ酸配列から作成したハイドロバシープロット(図1)から、N末端から16～29番目のアミノ酸残基に渡る長さ14残基の連続した1つの顕著な疎水性部分が認められ、トランスマンプレンドメイン(膜貫通領域)を有することが予想される。

【0025】尚、遺伝暗号の縮重による異なった塩基配列を有するDNAも本発明DNAに包含されることは、当業者であれば容易に理解されるところである。また、本発明DNAには、本発明DNAに相補的なDNA又はRNAも包含される。さらに本発明DNAは、SAT-

1をコードするコード鎖のみの一本鎖であってもよく、この一本鎖およびこれと相補的な配列を有するDNA鎖又はRNA鎖からなる二本鎖であってもよい。

【0026】また、本発明DNAは、SAT-1のポリペプチド全体をコードするコード領域全長の塩基配列を有していてもよく、またSAT-1のポリペプチドの一部分をコードする塩基配列を有するものであってもよい。

【0027】ところで、一般に哺乳動物のシアル酸転移酵素では、アミノ酸配列に高い相同性を有することが知られており、本発明DNAがコードするポリペプチドも、種間におけるアミノ酸配列の相同性は約6%以上と想定される。従って、本発明で具体的に開示しているDNAがコードするポリペプチドと高い相同性を有するポリペプチド及びそれをコードするDNAも本発明に包含される。上述のようにSAT-1のポリペプチドは膜貫通領域を有するが、膜内の末端にあたるN末端部から当該膜貫通領域を含む領域を欠失したSAT-1のポリペプチドの部分もまた本発明に包含される。このようなポリペプチドを具体的に例示すると、例えば配列番号2に示すアミノ酸配列におけるアミノ酸番号38～359などが挙げられる。

【0028】<2>本発明DNAの製造方法
以下、本発明DNAを得る方法について説明する。本発明によりSAT-1のポリペプチドのアミノ酸配列が明らかにされたので、その配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCR法(ポリメラーゼ・チエイン・リアクション法)によって染色体DNAあるいはmRNAから本発明DNAを増幅することによって取得することも可能であり、また、特に以下の各工程からなる発現クローニング法により製造することも可能である。

(1) 癌細胞を分化誘導剤で処理することにより分化させる。
(2) 分化した癌細胞からcDNAライブラリーを作成し、宿主細胞に導入する。
(3) ガングリオシドを細胞膜上に発現した宿主細胞を検出する。

(4) 上記で検出された宿主細胞をソーティングして、ライブラリーを濃縮する。

(5) 濃縮したライブラリーから導入した遺伝子を切り出す。

【0029】スクリーニングによって、通常には上記SAT-1の完全長cDNAを選択する。以下に、本発明DNAを製造する方法の一例を具体的に説明する。

(1) 癌細胞の分化誘導
癌細胞としては、浮遊系細胞が好ましく、そのような癌細胞として血球系のリンパ種及び白血病の細胞が挙げられ好ましい。そのような細胞として、例えばヒト由來のHL-60(ATCC CCL240)、MOLT-4

(ATCC CRL 1582)、U937 (ATCC CRL 1593)、マウス由来のM1 (ATCC TIB 192) 等の哺乳類由来の細胞が好ましく、新鮮骨髓性白血病細胞なども用いることが可能である。そのような癌細胞の中でもヒト由来の細胞が最も好ましく、特に HL-60 が分化誘導を行いやすいため好ましい。培養したこの癌細胞株に分化誘導剤を添加して 20 時間以上、好ましくは 24~48 時間程度培養することによって分化を誘導する。培養法としては使用する細胞によって適した条件下で行えばよいが、通常、一般的な細胞培養条件として 5~7 vol% CO₂、95~93 vol% 空気条件下で 37~38℃ が挙げられる。分化誘導剤としては例えばホルボールエステル (12-O-テトラデカノイルホルボールエステル (TPA) など)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、レチノイン酸 (RA) 及び 1α,25-ジヒドロキシビタミンD₃ (1α,25(OH₂D₃)) 等が挙げられ、特に限定はされないが、の中でも TPA が多くの白血病細胞株に対して比較的同様な分化誘導活性を有するため好ましい。例えば癌細胞として HL-60、分化誘導剤として TPA を使用する場合は、24 nM 程度の TPA 存在下で 48 時間培養することにより、HL-60 は単球・マクロファージ様に分化し、形態の変化が観察される。

【0030】(2) 分化した癌細胞からの cDNA の構築

①分化した癌細胞からの RNA の調製

上記 (1) で分化を誘導した癌細胞を好ましくは 500 ~ 2000 × g で遠心処理により回収し、細胞から例えばグアニジンチオシアネート / C s C l 法 (Kingston, R. E., (1991) in Current Protocols in Molecular Biology, Suppl. 14, Unit 4.2, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York) 等の公知の方法により全 RNA を調製する。このようにして得られる全 RNA から、オリゴ dT (oligo-(dT)) セルロースカラムクロマトグラフィー等によってポリ(A)⁺ RNA を精製する。

【0031】②ポリ(A)⁺ RNA からの cDNA の構築
上記ポリ(A)⁺ RNA を錆型とし、オリゴヌクレオチドプライマーを用いた逆転写 PCR により、癌細胞由来の cDNA を增幅することができる。PCR は、通常の方法と同様にして行えばよいが、具体的方法を示すならば以下の通りである。1 μl のポリ(A)⁺ RNA、それぞれ 100 pmol のオリゴ dT とランダムオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ 500 μM の 4 種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、200 単位の M-MLV 逆転写酵素 (ギブコ BRL (Gibco BRL))、1 mM ジチオスレイトール (DTT)、120 単位の RNase (リボヌクレアーゼ) インヒビター (宝酒造 (株) 製) を含む緩衝液 (終体積 20 μl) を 50℃ で 60 分間インキュベートし、cDNA 一次鎖を合成する。次に、上記の逆転

写反応混合液 5 μl、各 100 pmol のランダムオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ 250 μM の 4 種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、1.25 単位の Taq ポリメラーゼを含む反応液 (終体積 50 μl) に対し、95℃ 1 分、46~62℃ 1 分、72℃ 2 分を 35 サイクル繰り返して行う。

【0032】このようにして得られた癌細胞の cDNA は、発現ベクターに保持させた後、宿主細胞に導入して宿主細胞をスクリーニングするために使用される。宿主細胞としては、哺乳類由来の細胞株で、ラクトシルセラミド陽性である細胞であれば用いることができる。そのような細胞株としては例えばヒトナマルバ (Namalwa) 細胞 (細井ら: Cytotechnology, 1, 151 (1988))、チャイニーズハムスター由来の CHO 細胞 (ATCC CCL 61 等)、サル由来の COS 細胞 (ATCC CRL 1650 等)、マウス由来の 3LL 細胞 (Taniguchi, S., (信州大学加齢適応研究センター)) などが挙げられる。しかし、本発明において SAT-1 の酵素活性の検出をより容易にすることが可能であるため、更に GM₃ 隆性の培養細胞が好ましい。そのような細胞としては 3LL 細胞の突然変異株である 3LL-HK 46 細胞 (Inokuchi, J., (生化学工業 (株))) が挙げられ、好ましい。発現ベクターとしては pCEV18 (Maruyama, K. (東京大学医科学研究所、現東京医科歯科大学) より恵与)、pCXN2 (Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (Gene, 108, p193-200 (1991))、pFLAG-CMV-2 (Eastman Kodak 製)、pAGE107 (Miyajiら, Cytotechnology, 3, 133 (1990))、pAS3-3 (特開平 2-227075 号公報)、pAMoERC3 30 Sc (特開平 5-336963 号公報)、pCD2 (Chen, C. ら, Mol. Cell. Biol., 7, 2745-2452 (1987)) などが挙げられ、使用する宿主細胞に合わせて適宜選択される。例えば宿主細胞として 3LL-HK 46 を使用した場合は、pCEV18 を発現ベクターとして使用することが好ましい。ベクターへの上記で癌細胞のポリ(A)⁺ RNA を基に調製された PCR 産物の導入は、公知の方法から使用するベクターに適した方法が選択される。

【0033】③cDNA ライブライマーの宿主細胞への導入

上記の方法により構築した cDNA ライブライマーを公知の手法を用いて宿主細胞へトランスフェクションする。具体的には、例えばエレクトロポレーション法 (Miyaji ら, Cytotechnology, 3, 133 (1990))、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075 号公報) 及びリポフェクション法 (Philip, L.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)) などが挙げられ適宜選択されるが、エレクトロポレーション法が好ましい。また、SAT-1 をコードする cDNA を検出する際に、より正確な酵素活性の検出を行うため、GM₃ から合成されることが知られており、細胞膜上に発現し、容易に検出が

可能であるG D₃をG M₃から直接合成する酵素である、ヒト α 2-8シアル酸転移酵素をコードするDNA（特開平7-327678号公報など）を宿主細胞に前もってトランスフェクションしておくこと、及び、同時にトランスフェクションすることも可能であり、また、好ましい。従って、例えばベクターとしてpCEV18を使用して構築したcDNAライブラリーを、宿主細胞としてのG D₃合成経路を持たない3LL-HK46細胞に導入する際には、ライブラリーのcDNAを保持したpCEV18を、通常の3LL-HK46細胞に直接トランスフェクションしてもよいし、予め3LL-HK46細胞に α 2-8シアル酸転移酵素のcDNAを、pCEV18等の真核生物発現ベクターを用いて導入して作成した遺伝子組み換え体3LL-ST28にトランスフェクションしてもよいし、また、 α 2-8シアル酸転移酵素のcDNA導入したベクターと同時に3LL-HK46細胞にトランスフェクションしてもよい。

【0034】(3) ガングリオシドを発現した宿主細胞の検出

cDNAライブラリーを導入した宿主細胞は、一般的な細胞培養条件下で培養される。cDNAを導入した24時間以降、好ましくは36~48時間後に宿主細胞を抗ガングリオシド抗体あるいはガングリオシドに結合するレクチンを用いた免疫染色により染色するが、抗体を用いる染色法がより正確であり好ましい。例えば、宿主細胞として3LL-HK46を用いた場合には、細胞膜上に発現したG M₃を認識する例えば抗G M₃モノクローナル抗体 M2590 (L612 (ATCC CRL10724) が產生するモノクローナル抗体: J. Biol. Chem., 260, 13328-13333(1985)) を用いて検出する。免疫染色は一般的な方法に従って行えばよい。また、宿主細胞として例えば上記の3LL-ST28を用いた場合には、本発明DNAが導入された際に生成されるG M₃から合成されるG D₃を検出する。G D₃を検出するための免疫染色法としては通常用いられる一般的な方法（特開平2-327678号公報）によって行うことができる。その際は、使用する一次抗体としてはG D₃を認識する抗体であれば特に限定はされないが、モノクローナル抗体が好ましく、そのような抗体としては例えば抗G D₃モノクローナル抗体R24 (ハイブリドーマ(ATCC HB8445)が產生するモノクローナル抗体: Cancer Res., 49, p191-196 (1989)) などが挙げられ、好ましい。上記の一般的な抗体を用いる免疫染色法として具体的には、上記培養後の宿主細胞 (1×10⁵個) をBSA溶液 (0.1%BSA PBS (+)) で2~3回程度遠心洗浄し、一次抗体を含む100μlの前記BSA溶液に懸濁する。30分間氷冷下で反応させた後、上記BSA溶液で2回程度洗浄する。さらに一次抗体に対するFITC標識二次抗体1μlを含むBSA溶液100μl中で、氷冷条件下で30分間反応させる。BSA溶液で1回洗浄し、フロ

ーサイトメーター (FACScalibur: ベクトン・デッキンソン(Becton Dickinson)製) で、蛍光が強い細胞を検出する。蛍光の強い、例えば全体の5%の細胞をセルソーターで選別し、これからプラスミドDNAを抽出する。プラスミドDNAの宿主細胞からの抽出は一般的な公知の方法によって行われる。

【0035】(4) SAT-1のcDNAのソーティングとcDNAの取得

上記の操作により得られたプラスミドDNAを、適当な宿主細胞株にトランスフェクションし、上記抗G M₃抗体を用いる免疫染色と例えばフローサイトメーターによる全体の5%の強い蛍光を発する細胞の回収を2回以上繰り返し、目的のcDNAをソーティングにより濃縮する。前記ソーティングに用いる宿主細胞としては、哺乳類の培養細胞が好ましく、特に3LL-HK46が好ましい。また、使用するベクターとしては哺乳類細胞用の発現ベクターであれば特に限定はされないが、pCEV18が好ましい。ソーティングによって濃縮した目的のcDNAを保持した前記ベクターを、pBKCMV (ストラタジーン社製) などの哺乳類細胞用の発現ベクターに公知の方法により前記のヒト α 2-8シアル酸転移酵素のcDNAを導入した発現ベクターと同時に3KK-HK46細胞等のG D₃合成経路を有さない哺乳類由来の培養細胞にトランスフェクションし、上記と同様に免疫染色及びフローサイトメーターによる検出を行い、強蛍光を発する全体の5%の細胞を得る。この細胞から公知の方法によりプラスミドDNAを抽出する。このプラスミドDNAから一般的な方法によって切り出すことで得られるcDNAにより、大腸菌DH10B (E. coli DH10B: ギブコ社製) を形質転換し、これらを一穴あたり100コロニーを形成するよう植菌し、シブセレクションを行うことにより、最終的に約2.1Kbpのインサート (4C7) を含む单一のクローン、pCEV4C7を得ることができる。

【0036】(5) SAT-1をコードするcDNA 4C7の塩基配列の決定

上記のようにして得られたcDNAはそのままあるいはpCR IIなどの適当なプラスミドにサブクレーニングして、既知の一般的な方法により塩基配列を決定することができる。

【0037】上記のようにして決定されたSAT-1をコードするcDNAの塩基配列及びこの塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号1に、アミノ酸配列のみを配列番号2に示す。

【0038】また、膜貫通領域を欠失した、すなわち可溶化タンパク質形態のSAT-1のポリペプチドをコードするDNAは以下のようにして取得することが可能である。すなわち、まず配列番号1に示す塩基配列に基づき、当該酵素のポリペプチドのN-末端側で適当な短縮化形態となるように選択したプライマーを合成し、クロ

ーン化したS A T - 1 のc D N A を鋳型としてP C R 法により増幅する。例えば、N - 末端の3' 7アミノ酸残基が欠失した短縮化形態のポリペプチドをコードするD N A を得る場合には、例えば目的とする塩基配列の3' 及び5' 末端部に存在する塩基配列を基にオリゴヌクレオチドプライマーを合成する。例えば配列番号3及び4に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをそれぞれ5' プライマー及び3' プライマーとして用いてP C R を行えばよい。次いで、増幅して得られたP C R 産物を必要により精製して目的D N A を得ることが可能である。

【0039】<3>本発明D N A の塩基配列によってコードされるS A T - 1 のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチド

本発明は、上記の本発明D N A によってコードされるS A T - 1 のポリペプチドの全部又は部分からなるポリペプチドも提供する。本明細書において、上記のポリペプチドの「部分」とは、シアル酸転移酵素-1活性を有する、抗原性を有するなどの何らかの活性ないし機能を有する部分を意味する。本ポリペプチドは単独であってもよいし、他のポリペプチドと融合していてもよい。また、膜貫通領域を欠失していてもよい。

【0040】本ポリペプチドは、糖鎖を有していても有していないなくてもよい。また、糖鎖の種類にも特に限定はない。このようなポリペプチドは、例えば、後記のポリペプチドの製造方法によって得ることができ、また、上記の活性ないし機能の有無を判定することは、特開平7-327678号公報記載の酵素活性測定法において、宿主細胞に導入するc D N A と酵素の基質を変更することにより実施することができる。例えば本明細書中に具体的に記載されている方法により、当業者であれば容易に行うことができる。

【0041】<4>本発明D N A を利用したS A T - 1 のポリペプチドの製造方法

上記本発明D N A で形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、本発明D N A がコードするポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物からS A T - 1 のポリペプチドを採取することによって、S A T - 1 のポリペプチドを製造することができる。

【0042】本発明D N A で形質転換された細胞は、公知の発現ベクターに本発明D N A の断片を挿入して組換えプラスミドを構築し、この組換えプラスミドを用いて形質転換を行うことによって得ることができる。細胞としては大腸菌等の原核細胞や、哺乳類細胞等の真核細胞が例示される。大腸菌などの原核細胞を用いた際は、本発明D N A の発現によって生じるS A T - 1 のポリペプチドに糖鎖の付加が起こらないため、純粋にS A T - 1 のポリペプチドのみを得ることが可能であり、また、哺乳類細胞等の真核細胞を用いた際は、本発明D N A の発現によって生じるS A T - 1 のポリペプチドに糖鎖の付

加がなされる。そのため、糖鎖も含む通常のS A T - 1 と同様の形態で得ることが可能である。

【0043】本製造方法においては、タンパク質の製造に通常用いられる宿主-ベクター系を使用することができる。3 L L - H K 4 6 細胞、3 L L - S T 2 8 細胞又はC O S - 1 細胞等の哺乳類由来の培養細胞とp C E V 1 8 、p M E 1 8 S (丸山ら, Med. Immunol., 20, 27(1990)) 等の哺乳類細胞用発現ベクターとの組み合わせを採用することが好ましいが、特に限定はされない。培地や培養条件は、用いる宿主すなわち細胞に合わせて適宜選択される。

【0044】本発明D N A は全長を直接発現させてもよいが、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させてもよい。また、本発明D N A の一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。

【0045】上記融合ポリペプチドを発現する組み換えプラスミドの構築の具体例としては以下の方法が挙げられる。すなわち、本発明のD N A をp G I R 2 0 1 p r o t A (Kitagawa, H. and Paulson, J. C., J. Biol. Chem., 269, 1394-1401(1994)) 等のプラスミドに導入した遺伝子を融合タンパクとして発現させるように構築されたベクターに通常の方法により組み込み、複数のタンパク質をの遺伝子を同一読み出し領域に有するベクターを構築する。ついで、このベクターから融合タンパク質をコードするN h e I 断片を切り出し、上記と同様の操作によりp C E V 1 8 等の適当なベクターに連結させる。

【0046】培養物からの本発明ポリペプチドの採取は、公知のポリペプチドの精製方法によって行うことができる。具体的には例えば、ラクトシルセラミドあるいはC M P - シアル酸などを結合したセファロースカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーが挙げられる。融合ポリペプチドとして発現させた場合は、宿主細胞の培養物を上記アフィニティカラムのほか、S A T - 1 と融合したポリペプチドに対し親和性の高い物質(例えば抗体など)を結合したアフィニティクロマトグラフィーなどによって精製することができる。さらに、融合ポリペプチド中のS A T - 1 と他のタンパク質のポリペプチドとの間に、例えば特定のタンパク分解酵素が認識して切断するアミノ酸配列を有するリンカーを予め組み込んでおくことにより、融合ポリペプチドを精製した後にリンカー部位で融合ポリペプチドを切断することにより、従来精製が困難であったS A T - 1 を得ることが可能である。上記特定のタンパク質分解酵素とそれが認識する特定の配列の組合せとしては例えばプロインスリンの合成時に働くシグナルペプチダーゼとインスリンのシグナルペプチドの組合せが挙げられる。なお上記の培養物には、培地および当該培地中の細胞が含まれる。

【0047】シアル酸転移酵素の活性の測定方法としては、一般的なガングリオシド合成の測定法(特開平7-50

327678号公報など)において酵素の基質を変更することにより実施することが可能である。例えば上記培養物又は上記方法によって精製した酵素適量を、100 mM カコジル酸ナトリウム、10 mM 塩化マンガン、0.2 mM CMP-放射性物質標識シアル酸、0.4 mM ラクトシルセラミド、0.3% Triton CF-54を含む反応液をpH 6.5に調整し、37°Cで2時間保温した後、一般的な薄層クロマトグラフィーにより反応産物を展開し、フジックスBAS 2000バイオ・イメージング・アナライザ(富士写真フィルム(株)製)により活性の測定を行うことができる。

【0048】

【実施例】以下に本発明を実施例によりさらに詳説するが、本発明の目的を超えない限りこれに限定されるものではない。

(1) HL-60細胞の分化誘導とcDNAの構築
HL-60をTPA 24 nMを含むRPMI-1640(ニッスイ製)中で5 vol% CO₂、95 vol%空気、37°Cの条件下で48時間培養し、分化を誘導した。上記細胞を1000×gの遠心処理により回収し、グアニンチオシアネート-酸フェノール-クロロホルム法(AGPC法)により全RNAを調製した。5×10⁶個の分化した細胞から約40 μgのRNAが得られた。このRNAからオリゴdTセルロースカラムクロマトグラフィーによりポリ(A)⁺RNAを精製した。

【0049】このポリ(A)⁺RNAを逆転写反応の錠型とし、DNAの一次鎖を構築し、更にこのDNAを用いて2本鎖cDNAを合成した(Gubber, V. and Hoffman, B.J., Gene, 25, 283(1983))。

【0050】このようにして得られた2本鎖cDNAに、制限酵素BSTX1アダプターを連結し、pCEV18のBSTX1部位に導入してcDNAライプラリーを構築した。

【0051】(2) cDNAの3LL-HK46細胞へのトランスフェクション
上記のcDNAライプラリーを3LL-HK46細胞にエレクトロポレーション法を用いて導入し、48時間、5 vol% CO₂、95 vol%空気、37°C条件下で培養した。

【0052】(3) ガングリオンドを発現した宿主細胞の検出とcDNAの調製
培養後の3LL-HK46細胞を抗GM₃抗体であるM2590とFITC標識ウサギ抗マウスIgG抗体により免疫染色を行った。この染色した細胞をフローサイトメーター(FACScalibur)で蛍光が陽性の細胞を検出した。陽性例の5%の細胞を回収し、プラスミドDNAを調製した後、さらに2回、3LL-HK46細胞へのエレクトロポレーション法による導入と48時間培養、免疫染色及びフローサイトメーターによる検出、回収を繰り返した。

【0053】この方法で最終的に得られたプラスミドを、pBKCMVGD₃(ストラタジーン社製のpBK CMVプラスミドベクターにヒトα2-8シアル酸転移酵素(GD₃合成酵素)を導入したプラスミド)と共に3LL-HK46細胞に導入した。この細胞を48時間培養した後、抗GD₃抗体であるR24とFITC標識ウサギ抗マウスIgG抗体で免疫染色して、フローサイトメーターにより蛍光の強い細胞の5%を検出し、回収した。

【0054】この細胞から、プラスミドDNAを調製し、エレクトロポレーション法により大腸菌DH10B(ギブコ社製)を形質転換した。トランスフェクションとアンピシリンによる選別とを2回繰り返した後、陽性コロニー群を96穴マイクロプレート1穴あたり100コロニーの割合で小分けした。9枚のマイクロプレートに植菌し、シブセレクション法を行い1穴に絞り込み、この1穴に由来する2,400コロニーを1穴あたり1コロニーの割合で、96穴マルチプレート25枚に広げ、更にシブセレクションを行い陽性クローン(pCEV4C7)を得た。このpCEV4C7を3LL-HK46細胞に一過性に発現させて上記と同様に抗GM₃抗体(M2590)によるフローサイトメトリー解析を行った。対照としてpCEV18を一過性に発現させた3LL-HK46細胞は細胞膜上にGM₃を発現していないが、pCEV4C7を一過性に発現させた3LL-HK46細胞は細胞膜上にGM₃を発現し、蛍光が検出された。

【0055】(4) 塩基配列の決定

pCEV4C7の二本鎖DNAの塩基配列を、オートサイクルシークエンシングキット(ファルマシア社製)と、ファルマシア A.L.F. DNAシークエンサー(ファルマシア社製)を用いたデオキシチエントーミネーション法により決定した。このように決定された塩基配列とその塩基配列から予測されるアミノ酸配列を配列番号1に、アミノ酸配列のみを配列番号2に示す。pCEV4C7が有するcDNAインサート4C7は約2.1 kb pであり、202番目の塩基を翻訳開始点とする359アミノ酸残基を有するタンパク質(分子量41,244 Da)をコードすることが明かとなった。アミノ酸配列から予測される構造の模式図を図1に示す。ハイドロバシープロットによる解析の結果、N末端部16番目から29番目のアミノ酸残基の領域に膜貫通領域(図1中のTM)が存在する2型膜タンパク質であることが判明した。この配列をGenBankに登録されている遺伝子データベースで検索した結果、高度に相同性を示す配列は認められなかった。しかし、シアル酸転移酵素の配列の中央部及びC末端側領域に存在するシアル酸転移酵素相同領域のシアルモチーフ(L及びS)については、多少の置換が見られたものの、比較的高い相同性が認められた(図2)。比較に用いたシアル酸転移酵素は、h2.3

ST; 特開平5-336963号公報、rSTX; J. Biol. Chem., 268, 11504-11507(1993)、rST3N-1; J. Biol. Chem., 267, 21011-21019(1992)、hST3N-2; J. Biol. Chem., 268, 22782-22787(1993)、pST30-1; J. Biol. Chem., 267, 21004-21010(1992)、mST30-2; Eur. J. Biochem., 216, 377-385(1993)、mST4'; NCBI Seq. ID 55853 2、hSAT4(a); Glycobiology, 5, 319-325(1995)、hST6N; Nuc. Acids Res., 18, 667(1990)、rST6N; J. Biol. Chem., 262, 17735-17743(1987)、h2.8ST; 特開平7-3 27678号公報のそれぞれに記載の11種である。この結果から、pCEV4C7のインサート4C7がコードするSAT-1はシアル酸転移酵素ファミリーに属すると考えられる。更にアミノ酸配列からN-グリコリーションサイトにコンセンサスな配列が4つ存在することが示された(図1中、△で示す)が、N末端側の二つの部位は、膜貫通領域の近傍及びシアルモチーフ内に存在するので、C末端側の二つの部位よりもN-グリコリル化されている可能性が低い。

【0056】(5) SAT-1のcDNAを発現した細胞のGM₃合成

上記SAT-1をコードするcDNA(4C7)を発現ベクターpCEV18に導入したpCEV4C7を、エレクトロポレーション法により3LL-HK46に導入し、48時間培養後のこの細胞のGM₃合成活性を以下の方法により測定した。0.1mM CMP-[¹⁴C]-シアル酸(2×10³CPM)、0.4mMラクトシルセラミド、0.3%(W/V) Triton CF-5 4、10mM MgCl₂、100mM カコジル酸ナトリウム、150μgのpCEV4C7を導入した3LL-HK46のホモジナイズ液及び1mMのシアリダーゼ阻害剤(2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルシアル酸(2,3-dehydro-2-deoxy-NeuAc):ベーリンガー・マンハイム社製)を含むpH6.5の20μlの反応液を、37℃で2時間インキュベートした後、10μlのメタノールを添加して反応を停止した。反応液8μlをC18逆相系薄層クロマトグラフィープレート(RP-18W HPTLCプレート)(メルク社製)にかけ、水で10分間展開した。放射性物質標識反応産物を原点から搔き取り、GM₃をクロロホルム-メタノール(1:1、V/V)300μlにて抽出回収した。抽出物を乾固後、シリカゲル薄層クロマトグラフィー 60HPTLCプレート(メルク社製)に共した。クロロホルム-メタノール-0.5%CaCl₂水溶液(55:45:10,V/V)にて展開後、オルシノール硫酸により発色すると共に、ガングリオシドに取り込まれた放射活性をフジックスBAS2000バイオ・イメージング・アナライザー(富士写真フィルム(株)製)で測定した。その結果、¹⁴CのガングリオシドGM₃への取り込みが起こっていることが明らかとなり、SAT-1によるGM₃合成が

配列

SAT-1 cDNA導入細胞で検出された。

【0057】GM₃合成活性は、pH 6.0~7.0、特にpH 6.5付近で高く、また、10mM Mn²⁺存在下で1.5倍以上上昇した。

【0058】

【発明の効果】本発明によりラクトシルセラミドから細胞分化を誘導するガングリオシドGM₃を合成するα2-3シアル酸転移酵素(SAT-1)のDNAが提供される。また、本発明により、GM₃合成酵素であるα2-3シアル酸転移酵素が、上記DNAを使用することで容易に得られる。

【0059】本発明により、SAT-1をコードするDNAが得られたので、その発現機構を解明することによる細胞分化のメカニズムの解明が期待される。

【0060】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2121

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

生物名: ヒト

セルライン: 骨髄性白血病細胞株HL-60

配列の特徴

特徴を示す記号: CDS

存在位置: 202..1278

特徴を決定した方法: P

配列の特徴

特徴を示す記号: transmembrane domain

存在位置: 247..288

特徴を決定した方法: P

配列の特徴

特徴を示す記号: potential N-glycosylation site

存在位置: 871..879

特徴を決定した方法: S

配列の特徴

特徴を示す記号: potential N-glycosylation site

存在位置: 1201..1209

特徴を決定した方法: S

配列の特徴

特徴を示す記号: sialyl-motif

存在位置: 616..750

特徴を決定した方法: S

配列の特徴

特徴を示す記号: sialyl-motif

存在位置: 1048..1116

特徴を決定した方法: S

19

20

CCCGGGCTGG CGGCTTGCCA GCGCTCCCTC CCTAGCATGC ACACAGAGGC GGTGGGGGGC 60
 GCGGCGCGGA GCCCCCAGAA GCTGCGAAGC CAAGCAGCGG CACCTGCCCTG CCGAGCAATG 120
 CCAAGTGAGT TCACCTCTCC AAAGCTGAGA AGTGATTGCT CAAGGACCTC CCTGCAATGG 180
 TACACCCGAA CCCAGCACAA G ATG AGA AGA CCC AGC TTG TTA ATA AAA GAC 231
 Met Arg Arg Pro Ser Leu Leu Ile Lys Asp
 1 5 10
 ATC TGC AAG TGC ACG TTG GTT GCA TTT GGA GTC TGG CTC CTG TAC ATC 279
 Ile Cys Lys Cys Thr Leu Val Ala Phe Gly Val Trp Leu Leu Tyr Ile
 15 20 25
 CTC ATT TTG AAT TAC ACC GCT GAA GAA TGT GAC ATG AAA AGA ATG CAC 327
 Leu Ile Leu Asn Tyr Thr Ala Glu Glu Cys Asp Met Lys Arg Met His
 30 35 40
 TAT GTG GAC CCT GAC CGG ATA AAG AGA GCT CAG AGC TAT GCT CAG GAA 375
 Tyr Val Asp Pro Asp Arg Ile Lys Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Glu
 45 50 55
 GTC TTG CAG AAG GAA TGT CGG CCC AGG TAC GCG AAG AGC GCT ATG GCT 423
 Val Leu Gln Lys Glu Cys Arg Pro Arg Tyr Ala Lys Thr Ala Met Ala
 60 65 70
 CTG TTA TTT GAG GAC AGG TAC AGC ATC AAC TTG GAG CCT TTT GTG CAG 471
 Leu Leu Phe Glu Asp Arg Tyr Ser Ile Asn Leu Glu Pro Phe Val Gln
 75 80 85 90
 AAG GTC CCC ACG GCC AGT GAA GCT GAG CTC AAG TAT GAC CCG CCT TTT 519
 Lys Val Pro Thr Ala Ser Glu Ala Glu Leu Lys Tyr Asp Pro Pro Phe
 95 100 105
 GGA TTC CGG AAG TTC TCC AGT AAA GTC CAG AGC CTC TTG GAT ATG CTG 567
 Gly Phe Arg Lys Phe Ser Ser Lys Val Gln Ser Leu Leu Asp Met Leu
 110 115 120
 CCC GAA CAT GAC TTT CCT GAA CAC TTG AGA GCC AAG GCC TGC AAG CGC 615
 Pro Glu His Asp Phe Pro Glu His Leu Arg Ala Lys Ala Cys Lys Arg
 125 130 135
 TGT GTG GTT GTT GGG AAC GGG GGC ATC CTG CAC GGA CTA GAG CTG GGT 663
 Cys Val Val Val Gly Asn Gly Gly Ile Leu His Gly Leu Glu Leu Gly
 140 145 150
 CAC GCC CTC AAC CAG TTC GAT GTG GTC ATA AGG TTG AAC AGT GCG CCA 711
 His Ala Leu Asn Gln Phe Asp Val Val Ile Arg Leu Asn Ser Ala Pro
 155 160 165 170
 GTT GAG GGT TAC TCT GAA CAC GTT GGG AAT AAA ACT ACT ATA AGG ATG 759
 Val Glu Gly Tyr Ser Glu His Val Gly Asn Lys Thr Thr Ile Arg Met
 175 180 185
 ACT TAC CCA GAG GGT GCG CCA CTG TCG GAC GTT GAA TAC TAC GCC AAT 807
 Thr Tyr Pro Glu Gly Ala Pro Leu Ser Asp Val Glu Tyr Tyr Ala Asn
 190 195 200
 GAT TTG TTC GTT ACT GTT TTA TTT AAG AGT GTT GAT TTC AAG TGG CTT 855
 Asp Leu Phe Val Thr Val Leu Phe Lys Ser Val Asp Phe Lys Trp Leu
 205 210 215
 CAA GCA ATG GTC AAA AAT GAA AGC CTG CCC TTT TGG GTT CGC CTC TTC 903
 Gln Ala Met Val Lys Asn Glu Ser Leu Pro Phe Trp Val Arg Leu Phe
 220 225 230
 TTT TGG AAG CAA GTG GCA GAA AAA GTC CCA CTC CAG CCA AAG CAC TTC 951
 Phe Trp Lys Gln Val Ala Glu Lys Val Pro Leu Gln Pro Lys His Phe

| | | | | |
|--|-----|-----|-----|------|
| 235 | 240 | 245 | 250 | |
| AGG ATT TTG AAC CCA GTT ATC ATC AAA GAA ACT GCC TTC GAC ATC CTT | | | | 999 |
| Arg Ile Leu Asn Pro Val Ile Ile Lys Glu Thr Ala Phe Asp Ile Leu | | | | |
| 255 | 260 | 265 | | |
| CAG TAC TCA GAG CCT CAG TCA AGA TTC TGG GGC CAT GAT AAG AAC ATC | | | | 1047 |
| Gln Tyr Ser Glu Pro Gln Ser Arg Phe Trp Gly His Asp Lys Asn Ile | | | | |
| 270 | 275 | 280 | | |
| CCC ACG ATC GGC GTC ATT GCC GTT GTC GCT ACA CAT CTG TGT GAT | | | | 1095 |
| Pro Thr Ile Gly Val Ile Ala Val Val Leu Ala Thr His Leu Cys Asp | | | | |
| 285 | 290 | 295 | | |
| GAA GTC AGC CTG GCA GGC TTT GGC TAC GAC CTC AGT CAA CCC AGG ACC | | | | 1143 |
| Glu Val Ser Leu Ala Gly Phe Gly Tyr Asp Leu Ser Gln Pro Arg Thr | | | | |
| 300 | 305 | 310 | | |
| CCT CTG CAC TAC TTT GAC AGT CAG TGC ATG GGC GCC ATG CAC TGG CAG | | | | 1191 |
| Pro Leu His Tyr Phe Asp Ser Gln Cys Met Gly Ala Met His Trp Gln | | | | |
| 315 | 320 | 325 | 330 | |
| GTC ATG CAC AAT GTG ACC ACA GAG ACC AAG TTC CTC CTG AAG CTC CTC | | | | 1239 |
| Val Met His Asn Val Thr Thr Glu Thr Lys Phe Leu Leu Lys Leu Leu | | | | |
| 335 | 340 | 345 | | |
| AAG GAG GGC GTG GTG GAG GAC CTC AGC GGC GGC ATC CAC TGAGAACTCG | | | | 1288 |
| Lys Glu Gly Val Val Glu Asp Leu Ser Gly Gly Ile His | | | | |
| 350 | 355 | | | |
| GAACACGGCA AACCTCACCC AGCACCGCAG CTGAGAGCGT GGTGAGCAGC CTCCACAGGG | | | | 1348 |
| ACTTCACCCCT GCAGCTGCTT CGATGTGAG CTAGTGTGTT CAAACTCCAC ATTTTTTTA | | | | 1408 |
| AAAAAGGAAA AGAAAGAACAA CAAAGCTCT GCTCTGTGCA CCTCTTCGTC | | | | 1468 |
| CTATTTATTT GAAGTCAGTG TTGGATTTTG CACAGTTTG TAAGTTAAC TTAAGAATGG | | | | 1528 |
| GATTTGAAGG ACTTTCAAA GAGAATTGTA TAGTTTATTG TTTTTAAGG AAGTAATTAA | | | | 1588 |
| ATTTGCAGAA ACTGTACACA CGTACTCTGC TCAGGTGTTG AGGTGGGAGG AGAGGGGCTT | | | | 1648 |
| CTGGCCCCCTG GATGATGGCT GTGATGCCCG ATACTGGGTT CTGCTGCTCT GTTTGGTAGA | | | | 1708 |
| ACTGATGGCA GAGAAACTTC CTGCCTCCAG GATAAAGGGC TTACTCATCA CCTCTGGCAG | | | | 1768 |
| CTGCTAGACA AGTTCTAAC CCCTTTCTGC TAGTCCATCT GCCAGCTGGC TCGCAGGACT | | | | 1828 |
| CAGGCAGGGC AGCTGTCCCCG GAGGCTGCTG GTTGGTGAGC CACTGTCAGC TGAGGCCGT | | | | 1888 |
| GATGTTGCC CAGGGTGGAA GAAGCCACAC TTCCCTACACT GTCAGGGCAC TTTTAAACTT | | | | 1948 |
| CTGGAGGGGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT | | | | 2008 |
| GTTCATTCTG CCCTTCCAAA TCATCTAACT GTTATTTAAG GCACTCTGCT GTTTGTATGA | | | | 2068 |
| GATGGTTCAT AGAAATTATG ACAAAAGCCTT TGTTATCCAG GCCATGGAA GAG | | | | 2121 |

【0061】配列番号：2

トボロジー：直鎖状

配列の長さ：359

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

配列

| | | | | |
|---|----|----|----|--|
| Met Arg Arg Pro Ser Leu Leu Ile Lys Asp Ile Cys Lys Cys Thr Leu | | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 | |
| Val Ala Phe Gly Val Trp Leu Leu Tyr Ile Leu Ile Leu Asn Tyr Thr | | | | |
| 20 | 25 | 30 | | |
| Ala Glu Glu Cys Asp Met Lys Arg Met His Tyr Val Asp Pro Asp Arg | | | | |
| 35 | 40 | 45 | | |
| Ile Lys Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Glu Val Leu Gln Lys Glu Cys | | | | |
| 50 | 55 | 60 | | |
| Arg Pro Arg Tyr Ala Lys Thr Ala Met Ala Leu Leu Phe Glu Asp Arg | | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 | |

Tyr Ser Ile Asn Leu Glu Pro Phe Val Gln Lys Val Pro Thr Ala Ser
 85 90 95
 Glu Ala Glu Leu Lys Tyr Asp Pro Pro Phe Gly Phe Arg Lys Phe Ser
 100 105 110
 Ser Lys Val Gln Ser Leu Leu Asp Met Leu Pro Glu His Asp Phe Pro
 115 120 125
 Glu His Leu Arg Ala Lys Ala Cys Lys Arg Cys Val Val Val Gly Asn
 130 135 140
 Gly Gly Ile Leu His Gly Leu Glu Leu Gly His Ala Leu Asn Gln Phe
 145 150 155 160
 Asp Val Val Ile Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val Glu Gly Tyr Ser Glu
 165 170 175
 His Val Gly Asn Lys Thr Thr Ile Arg Met Thr Tyr Pro Glu Gly Ala
 180 185 190
 Pro Leu Ser Asp Val Glu Tyr Tyr Ala Asn Asp Leu Phe Val Thr Val
 195 200 205
 Leu Phe Lys Ser Val Asp Phe Lys Trp Leu Gln Ala Met Val Lys Asn
 210 215 220
 Glu Ser Leu Pro Phe Trp Val Arg Leu Phe Phe Trp Lys Gln Val Ala
 225 230 235 240
 Glu Lys Val Pro Leu Gln Pro Lys His Phe Arg Ile Leu Asn Pro Val
 245 250 255
 Ile Ile Lys Glu Thr Ala Phe Asp Ile Leu Gln Tyr Ser Glu Pro Gln
 260 265 270
 Ser Arg Phe Trp Gly His Asp Lys Asn Ile Pro Thr Ile Gly Val Ile
 275 280 285
 Ala Val Val Leu Ala Thr His Leu Cys Asp Glu Val Ser Leu Ala Gly
 290 295 300
 Phe Gly Tyr Asp Leu Ser Gln Pro Arg Thr Pro Leu His Tyr Phe Asp
 305 310 315 320
 Ser Gln Cys Met Gly Ala Met His Trp Gln Val Met His Asn Val Thr
 325 330 335
 Thr Glu Thr Lys Phe Leu Leu Lys Leu Leu Lys Glu Gly Val Val Glu
 340 345 350
 Asp Leu Ser Gly Gly Ile His
 355

【0062】配列番号：3

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：17

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGAAAAGAA TGGACTA

17

【0063】配列番号：4

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：17

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCAGTGGATG CCCGCTGA

17

【0064】配列番号：5

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：18

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

配列

Leu Leu Lys Leu Leu Lys Glu Gly Val Val Glu Asp Leu Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Ile His

【0065】配列番号: 6

配列の長さ: 48

配列の型: アミノ酸

配列

Cys Lys Arg Cys Val Val Val Gly Asn Gly Gly Ile Leu His Gly Leu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gly His Ala Leu Asn Gln Phe Asp Val Val Ile Arg Leu Asn
 20 25 30
 Ser Ala Pro Val Glu Gly Tyr Ser Glu His Val Gly Asn Lys Thr Thr
 35 40 45

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の α 2-3シアル酸転移酵素 (SAT-1) の構造の模式図。△は、アミノ酸配列から推定されるN-グリコシレーション部位である。TMはアミノ酸配列から推定される膜貫通領域である。

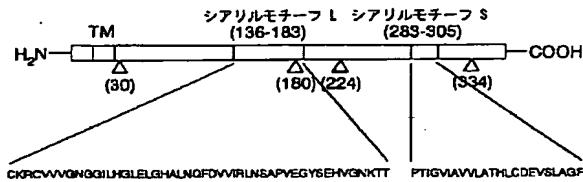
【図2】 SAT-1のシアルモチーフ (L及びS) 領域のアミノ酸配列と、他のシアル酸転移酵素のシアリ

トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: タンパク質

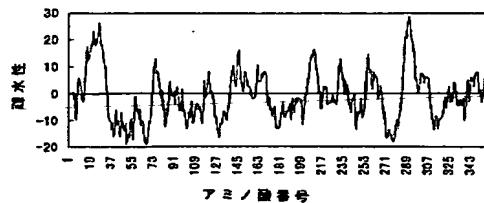
ルモチーフ領域との対比を示す図。配列の下に付した*は他のシアル酸転移酵素のシアルモチーフに見られる共通配列である。配列の上に付した*はSAT-1の、当該シアルモチーフの共通配列とアミノ酸が同一の部分であり、-は異なる部分である。

【図3】 本発明DNAから推定したSAT-1のアミノ酸配列のハイドロバシープロット。

【図1】



【図3】



【図2】

シアルモチーフL
 SAT-1 186 CIRGVVVGNG GILBGELEGG ALNQFDVVIR LNSAPV-EGY SEHVGKNTT 183
 b2.8ST 117 CIRGVVVGNG BRLRNSSLLGG VINKYDYYVIR LNNAPV-AGY EGDVGSKTT 164
 rSTX 154 PQTCAIVGNS GVLINNSGCGQ EIDTBSFVIR CILAPV-AGY ARDVGLKTD 201
 rSTSN-1 156 CIRGC1IVGNG GVLANKSLLS RIDDYDIVIR LBSAPV-KGF EGDVGSKTT 203
 bST3N-2 119 CIRGVVVGNG BRLRNSSLLGG AINKYDYYVIR LNNAPV-AGY EGDVGSKTT 160
 bST3D-1 142 CIRCAVVGNS GNLKESYYGQ QIDSBDPVLR EKKAPT-EGF EADVGSKTT 159
 bST3D-2 156 CIRCAVVGNS CNLKDKSSYGC EIDSDDFVLR EKKAPT-EGF EADVGSKTT 163
 bST4' 117 CIRGVVVGNG BRLRNSSLLGG VINKYDYYVIR LNNAPV-AGY EGDVGSKTT 164
 bSAT4(a) 141 CIRCAVVGNS GSLKKSQQLGR EIDDBDAVLR FNGAPT-AGF QGDVGKTT 228
 bST6N 181 VGRCAVVGSSA GSLKKSQQLGR EIDDBDAVLR FNGAPT-AGF QGDVGKTT 225
 rST6K 178 VGRCAVVGSSA GSLKKSQQLGR EIDDBDAVLR FNGAPT-AGF QGDVGKTT 225
 b2.8ST 120 LKEKCAVVGNG GILKKSQGCR QIDBANFVMR CNLPPLSSEY TIDVGSKSQ 168

シアルモチーフS

SAT-1 289 PTIGVIAVVL ATBLCDEVSL AGF 805
 b2.8ST 258 PTIGLLAIVL ALBLCDLVBI AGF 281
 rSTX 293 PTIGLLWVTL ATBFCNQIYL YGF 315
 rSTSN-1 293 PTIGSVAVTH ALDGCDEAV AGF 321
 bST3N-2 255 PTIGLLAIVL ALBLCDLVBI AGF 277
 pST3D-1 270 PTIGCILSVIF SLEBICDEVDL YGF 292
 pST3D-2 264 PSTGILSIIIF SLEBICDEVDL YGF 286
 rST4' 259 PTIGLLAIVL ALBLCDLVBI AGF 281
 bSAT4(a) 267 PTIGCILSVIF SLEBICDEVDL YGF 269
 bST6N 321 PSSGWL6111 WNTLCDQVDI YEF 343
 rST6N 318 PSSGWL6111 WNTLCDQVDI YEF 340
 b2.8ST 258 LSIGLTLVSA ALGLCCEEVAI YGF 250